黄颡鱼促甲状腺激素受体基因的克隆及其对饲料中添加碘化钾的表达反应

王春玲[1,2]　章宏塔[1]　高有领[1*]　钱国英[1*]

（1.浙江万里学院生物与环境学院，宁波 315100；2.上海海洋大学水产与生命学院，上海 201306）

摘　要：本试验旨在得到黄颡鱼促甲状腺激素受体（*TSHR*）基因的 cDNA 全长序列，同时掌握其组织表达差异，并揭示饲料中添加碘化钾对黄颡鱼甲状腺 *TSHR* 基因表达及生长性能的影响。采用 cDNA 末端快速扩增（RACE）技术克隆 *TSHR* 基因 cDNA 全长序列，再应用荧光定量 PCR 技术检测 *TSHR* 基因的相对表达量，并制备了碘化钾添加量分别为 0（对照）、10、50 和 100 mg/kg 的 4 种试验饲料进行为期 27 d 的黄颡鱼养殖试验。结果显示：本试验成功克隆得到长度为 2 786 bp 的 *TSHR* 基因 cDNA 的全长序列，其中开放阅读框 2 238 bp，编码 745 个氨基酸，Blast 程序分析表明黄颡鱼 TSHR 氨基酸序列与其他已知鱼类的相似性为 60%~87%。组织表达分析结果表明 *TSHR* 基因在甲状腺组织中的相对表达量较高，其次是肝脏、肌肉和肠道。养殖试验结果表明，100 mg/kg 组甲状腺 *TSHR* 基因相对表达量显著高于其他各组（$P<0.05$），50 和 100 mg/kg 组的增重、特定生长率和饲料系数显著优于对照组（$P<0.05$）。由此得出，饲料中添加适量的碘化钾不仅影响 *TSHR* 基因的表达，还能有效促进黄颡鱼的生长。

关键词：黄颡鱼；碘化钾；促甲状腺激素受体；基因克隆；基因表达

中图分类号：S963　　　　　　　　文献标识码：A　　　　　　　　文章编号：

甲状腺激素（THs）由甲状腺组织合成和分泌，包括四碘甲状腺原氨酸（T_4）和 3,5,3-

收稿日期：2015-09-15
基金项目：浙江省自然科学基金（LY14C190009）；浙江省重大科技专项（2012C12907）；宁波市科技局项目（2014A610193，2012B82016）
作者简介：王春玲（1989:），女，河南周口人，硕士研究生，从事水产动物营养与饲料科学研究，E-mail: chunling209@163.com
*通信作者：高有领，副教授，E-mail: gaoyl@zwu.edu.cn；钱国英，教授，E-mail: qiangy@zwu.edu.cn

三碘甲状腺原氨酸（T_3），是含量极低的生物活性物质，几乎作用于水生动物的各个部分，研究证实 THs 不仅可以促进机体的生长、发育，维持机体代谢平衡，还能够促进神经系统的发育，提高其兴奋性，维持机体的免疫系统[1-4]。鱼类 THs 的分泌过程与高等脊椎动物相似，其中碘和促甲状腺激素受体（TSHR）是 THs 合成途径中的 2 个重要因素，碘由钠碘转运蛋白运输到甲状腺滤泡内，碘化合成一碘酪氨酸和二碘酪氨酸，进而生成 THs[5-6]。因此碘是机体生长和代谢过程中的一种必不可少的微量元素，目前已经证实饲料中缺乏碘会引起鱼类甲状腺功能减退以及甲状腺肿等症状[7]。NRC 标准中鱼类对饲料中碘的需求量较低，但是在低碘含量的淡水区域常因为碘含量的不足而引起缺碘性疾病的发生，因此，在饲料中补充碘能有效地增加鱼类对饲料中碘的摄取量，从而维持其正常的生长、代谢。

TSHR 是一种 G 蛋白-偶联受体，属于糖蛋白激素受体超家族的成员，能与促甲状腺激素结合激发甲状腺的一系列反应，从而促进 THs 的释放；不同物种间 TSHR 结构很保守，主要由 7 个跨膜螺旋结构域、短的胞质域和较大的胞外域构成，其中胞外域含富亮氨酸重复序列，胞外域主要负责配体的特异性结合[8-9]。TSHR 与促甲状腺激素信号特异性结合后，激活典型的 G-蛋白偶联效应器（腺苷酸环化酶和磷酸酯酶 C），诱发胞内信号级联反应，刺激甲状腺组织合成、分泌 T_4，随后 T_4 在脱碘酶的作用下转化为 T_3，进而调节机体的生长、发育等生命过程[10-12]。因此，TSHR 在所有脊椎动物垂体-甲状腺轴的调节过程中具有极其重要的作用。目前已在分子水平上对大麻哈鱼（*Oncorhynchus rhodurus*）[13]、条纹狼鲈（*Morone saxatilis*）[8]、非洲鲶（*Clarias gariepinus*）[14]、斑点叉尾鮰（*Ictalurus punctatus*）[15]、欧洲狼鲈（*Dicentrarchus labrax*）[16]和塞内加尔鳎（*Solea senegalensis*）[9]等鱼类的 *TSHR* 基因进行了研究，但有关黄颡鱼 *TSHR* 基因的研究尚未见报道。

鉴于 *TSHR* 基因和碘的重要作用，本研究首先采用反转录 PCR(RT-PCR)和 cDNA 末端快速扩增（RACE）技术克隆黄颡鱼 *TSHR* 基因的全长 cDNA 序列，并分析黄颡鱼 *TSHR* 基因在不同组织中的表达差异性，在此基础上，由于碘对甲状腺功能的重要性，或能对 *TSHR*

基因产生影响，因此本研究的第 2 个目的是揭示饲料中添加不同水平的碘化钾对黄颡鱼 *TSHR* 基因表达及黄颡鱼生长的影响。

1 材料与方法

1.1 试验材料

基因克隆所用黄颡鱼购自浙江省宁波市鄞州区东裕菜市场，选取 1 条健康的黄颡鱼（*Pelteobagrus fulvidraco*），体重 145.2 g，体长 24 cm，解剖后取脑、甲状腺、心脏、肝脏、脾脏、肌肉、肾脏、性腺、头肾、胃、肠道组织，用液氮速冻研磨并分别取部分进行混合，随后将混合后的组织加入装有 Trizol 的离心管中混匀，置于-80 ℃超低温冰箱保存，用于提取总 RNA。

本研究所采用的主要试剂包括 SuperQuickRT cDNA Kit 和 2xEs TaqMasterMix，购自康为世纪生物科技有限公司，SMARTer® RACE cDNA Amplification Kit 购自 Clontech 公司，DL1000 DNA Marker、DL5000 DNA Marker、DNase I、TaKaRa LA Taq with GC Buffer、pMD™19-T Vector Cloning Kit、SYBR® Premix Ex Taq™ II（TliRNaseH Plus）购自 TaKaRa 公司，Trans5αChemically Competent Cell 购自北京全式金生物技术有限公司，GenClean 琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒（离心柱型）购自上海捷瑞生物工程有限公司，碘化钾购自 SIGMA 公司(纯度>99.5%)。其它常用的化学试剂均为国产分析纯。

1.2 养殖试验

试验饲料以市售黄颡鱼饲料为基础饲料（杭州海皇饲料开发有限公司，2 号料，粗蛋白质含量为 41%），分别添加 0（对照）、10、50 和 100 mg/kg 的碘化钾配制成 4 种试验饲料，碘化钾含量实测值分别为 0.31、8.58、47.50 和 92.63 mg/kg，换算成碘含量后的结果列于表 2。添加方法为：首先将碘化钾溶于水中，将其加入粉碎后的市售饲料中混匀，用绞肉机制成直径为 3 mm 的饲料，低温风干后，用密封袋封装后置于冰箱中（-20 ℃）冷冻保藏，备用。试验料的主要营养成份列于表 1。

表 1　试验饲料的营养水平（干物质基础）

Table 1　Nutrient levels of experiment diets (DM basis)　mg/kg

营养水平 Nutrient levels	碘化钾添加量 KI addition/(mg/kg)			
	0	10	50	100
粗蛋白质 Crude protein	435.9	443.8	445.1	442.8
粗脂肪 Crude fat	69.0	74.2	76.7	73.8
粗灰分 Ash	106.5	103.4	109.7	106.6
碘 I	0.24	6.56	36.31	70.81

养殖试验用鱼购自浙江省余姚市水产技术推广总站的黄颡鱼养殖基地，选取均重为 30.3 g 的健康黄颡鱼 120 尾，将鱼随机放入 8 个鱼缸内（容量 300 L），每缸 15 尾。将 8 个鱼缸随机分成 4 组，每组 2 个鱼缸，每天定时投喂 2 次（09:00 和 16:00），表观饱食投喂，采食约 30 min 后收集残饵称重。每天观察黄颡鱼的活动状况，定期用二氧化氯对水体进行消毒。试验用水为曝气的自来水，光照为自然光源，用增氧机昼夜持续增氧，每天 12:00 清洗养殖水桶并换水，换水量为总水量的 1/2，以保持水体清新。试验期共 27 d。饲养期间测定水温、溶解氧浓度和摄食量。试验期间水温 22~24 ℃，溶解氧浓度大于 6.2 mg/L。养殖 27 d 后进行称重，每个鱼缸随机取 5 尾鱼采样，每尾鱼称重并测量体长，解剖后称肝脏、肠道重，并取甲状腺组织用液氮速冻后置于-80 ℃超低温冰箱保存，用于后续的荧光定量 PCR 测定。

1.3　总RNA提取和cDNA第1链的合成

各个组织（用于荧光定量）以及混合组织样品（用于基因克隆）分别用 Trizol Reagent 法提取总 RNA，并检测其质量，方法如下：DNase I 去除其中的 DNA 杂质，用 Nanodrop2000 核酸蛋白分析仪检测 RNA 的浓度和纯度（1.9<A260/A280<2.1），并用 1.2%的琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性。使用康为世纪公司的 SuperQuickRT cDNA Kit 并参照说明书反转录合成 cDNA，-20 ℃保存。反应体系为 10 μL：dNTP Mix 为 2 μL、Primer Mix 为 1 μL、RNA

模板为 1 μL、RT 缓冲液为 2 μL、反转录酶为 0.5 μL、双蒸水（ddH$_2$O）为 3.5 μL。反应条件如下：37 ℃反应 15 min、85 ℃反应 5 s。以混合组织提取的 RNA 为模板，按照 SMARTer® RACE cDNA Amplification Kit 说明书合成 RACE cDNA 模板，-20 ℃保存。

1.4 *TSHR*基因cDNA全长克隆

将 NCBI 数据库 GenBank 中斑点叉尾鮰（NM_001200192.1）、非洲鲶（AY129556.1）、条纹狼鲈（AF239761.1）、罗非鱼（NM_001279621.1）、斑马鱼（NM_001145763.2）和塞内加尔鳎（FN677495.1）*TSHR* 基因的核苷酸序列进行比对，并用 Bioedit 和 Oligo 6.0 软件在保守区域内设计简并引物 TSHR-F1 和 TSHR-R1（表 2），引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。PCR 反应体系：2xEs TaqMasterMix 为 5 μL，混合组织 cDNA 为模板 0.2 μL，上、下游引物（10 μM）各 0.4 μL，ddH$_2$O 为 4 μL。反应程序为：94 ℃预变性 2 min；94 ℃变性 30 s，51.2 ℃退火 30 s，72 ℃延伸 45 s，30 个循环；72 ℃终延伸 10 min；4 ℃保存。产物经 1.5%琼脂糖凝胶电泳分离检测，并用 GenClean 琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒（离心柱型）回收纯化，送到上海华大基因科技服务有限公司测序，测得 815 bp 的扩增产物，符合预期大小，BLAST 分析结果表明该序列为 *TSHR* 基因的部分序列，根据该部分序列，利用 Oligo 7 软件设计 RACE 特异性引物 3-RACE-F2-1、3-RACE-F2-2 和 5-RACE-R2-1、5-RACE-R2-2；5-RACE-R3-1、5-RACE-R3-2、5-RACE-R3-3；5-RACE-R4-1、5-RACE-R4-2（表 2），分别用于 *TSHR* 基因的 3’端和 5’端的 RACE 扩增，其中 5’端 RACE 采用 3 对特异性引物扩增成功。为了提高扩增 PCR 的特异性，3’端和 5’端的 RACE 扩增均采用巢式 PCR 扩增技术。反应体系：TaKaRa LA Taq 为 0.5 μL，2xGC BufferⅡ为 25 μL，dNTP Mixture 为 8 μL，模板 cDNA（第 1 轮 PCR 产物）为 2 μL，特异性引物为 2 μL，UPM（NUP）引物为 5 μL（2 μL），ddH$_2$O 补足 50 μL，PCR 反应程序：94 ℃预变性 2 min；94 ℃变性 30 s，退火温度反应 30 s，72 ℃延伸指定时间，30 个循环；72 ℃终延伸 10 min；4 ℃保存，其中退火温度根据引物的温度确定，延伸时间根据酶的扩增效率及预测的扩增产物大小确定。

PCR 扩增产物首先进行纯化，随后克隆到 pMD^{TM}19-T Vector 载体上，转化到 Trans5α Chemically Competent Cell 内，经 LB 平板（含 Amp+）培养以及 M13 和特异性引物的菌液 PCR 筛选后，挑选阳性克隆菌送往上海华大基因科技服务有限公司测序。

1.5 *TSHR*基因序列拼接及生物信息学分析

将简并引物扩增的部分序列、5'端 RACE 克隆序列和 3'端 RACE 克隆序列用 DNAStar 软件中的 Seqman 程序拼接，即得到黄颡鱼 *TSHR* 基因的全长 cDNA 序列；用 ExPASy（http://web.expasy.org/translate/）在线翻译 *TSHR* 基因序列，推断其开放阅读框序列和编码的氨基酸序列；用 DNAStar 软件中的 EditSeq 程序推断 TSHR 蛋白的分子质量、等电点等；利用 DNAStar 中 MegAlign 程序对已获得的黄颡鱼 TSHR 的氨基酸序列与非洲鲶（AAN01360.1）、斑点叉尾鮰（AY533543）、斑马鱼（NM001145763.2）、塞内加尔鳎（CBK38913.1）和大口黑鲈（AKC32650.1）TSHR 的氨基酸序列进行多序列比对并分析各物种间 TSHR 氨基酸序列的相似性和分歧度；用 SignalP 4.1 Server 在线软件（http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/）预测分析信号肽；用 TMHMM 在线软件（http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/）预测分析氨基酸的跨膜螺旋结构；用 NetNGlyc 在线软件（http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/）预测分析 N-糖基化位点；用 NetPhos 2.0 Server 在线软件（http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/）预测分析磷酸化位点；用 PSIPRED v3.3 在线软件（http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/）分析 TSHR 蛋白的 2 级结构；用在线程序 SMART（http://smart.embl-heidelberg.de）分析氨基酸的保守结构域。采用 MEGA 6.0 软件中的邻位相接（NJ）法对不同物种的 TSHR 氨基酸序列构建系统进化树，设置 Bootstrap 的值为 1 000，计算各分支的置信度。

表 2　采用的引物及其序列

Table 2　Primers and their sequences used in the experiment

引物名称	序列	序列信息

Primers name	Sequence （5’-3’）	Sequence information
TSHR-F1	CCTGAYGASTTYAAYCCYTGYGAGGAC	简并引物
TSHR-R1	TTGTARTGRCTGGTSAGMAGCAC	简并引物
3-RACE-F2-1	GCAAGCGAGTTGTCAGTTTACACC	3’端 RACE
3-RACE-F2-2	GTTTGTCACATGCCTCCGCTGTC	3’端 RACE
5-RACE-R2-1	TGTGACAAACGCAGTTTACGATCT	5’端 RACE
5-RACE-R2-2	GGCAATGAGAAGCAGATAGAGG	5’端 RACE
5-RACE-R3-1	GTCTGCCAGTCTATTGCAT	5’端 RACE
5-RACE-R3-2	CCATCAAATTTCCAAGTACAGCC	5’端 RACE
5-RACE-R3-3	AAAGCCCAAATCATGGTCAGC	5’端 RACE
5-RACE-R4-1	GGTTCTTGAATGCACAGCAATGACT	5’端 RACE
5-RACE-R4-2	CACATCAAGCAGCACTGGACCACT	5’端 RACE
UPM（长 long）	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATC AACGCAGAGT	接头引物
UPM（短 short）	CTAATACGACTCACTATAGGGC	接头引物
NUP	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	接头引物
TSHR-qF	GCCTCTATCTGCTTC TCATT	荧光定量引物
TSHR-qR	TGTCTGCCAGTCTATTGC	荧光定量引物
GAPDH-F	ATTCTGGGATACACTGAGGA	荧光定量内参引物
GAPDH-R	TGTCGTTGAGGGAAATGC	荧光定量内参引物

1.6 *TSHR*基因的组织表达差异

为了检测黄颡鱼体内 *TSHR* 基因的表达情况，根据 GenBank 中作为内参的黄颡鱼甘油醛-3-磷酸脱氢酶（*GAPDH*）基因（JQ068865.1）序列以及本试验克隆得到的黄颡鱼 *TSHR*

cDNA 序列分别设计合成实时荧光定量 PCR 的内参引物 GAPDH-F 和 GAPDH-R 及 *TSHR* 基因引物 TSHR-qF 和 TSHR-qR（表 2）。实时荧光定量 PCR 的反应体系：2×SYBR® Premix Ex Taq Ⅱ（TliRNaseH Plus）为 6 μL，上、下游引物各 0.24 μL，ROX reference Dye Ⅱ为 0.24 μL，ddH_2O 补足至 12.5 μL。荧光定量 PCR 反应程序：95 ℃预变性 30 s；95 ℃变性 5 s，55.2 ℃退火 30 s，40 个循环；95 ℃反应 15 s，60 ℃反应 60 s，95 ℃反应 15 s（制备熔解曲线）。反应结束后，根据熔解曲线分析 PCR 反应是否正常，最后得出各组织 *TSHR* 基因 mRNA 相对表达量的关系图。

1.7 分析方法

粗蛋白质含量采用凯氏定氮法[17]测定，粗脂肪含量采用索氏抽提法[18]测定，粗灰分含量采用 GB/T 5009.4—2010[19]的方法进行测定，水分含量采用直接干燥法进行测定[20]，碘含量采用 GB/T 13882—2010[21]的方法进行测定。

1.8 计算方法

特定生长率（SGR）=100×（ln 末重-ln 初重）／养殖天数；

饲料系数（FCR）=摄食量／增重；

肥满度（CF）=体重／体长 ^{3}；

肝胰指数（HSI,%）=100×肝脏重／体重；

肠指数（%）=100×肠重／体重。

1.9 数据分析

实时荧光定量 PCR 的数据采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算[22]，黄颡鱼各组织的 *TSHR* 基因的表达量是相对于肌肉组织 *TSHR* 基因的表达量。采用 SPSS 19.0 对黄颡鱼生长试验相关数据做单因素方差分析（one-way ANOVA），所有数据以“平均值±标准差”表示。

2 结果与分析

2.1　黄颡鱼*TSHR*基因的克隆及序列分析

以黄颡鱼混合组织 cDNA 为模板，克隆出与预期大小相符的 cDNA 片段，利用预测的氨基酸序列在 NCBI 数据库中进行同源性分析，该目的基因与鲶形目斑点叉尾鮰的 *TSHR* 基因很相似，表明该基因为黄颡鱼的 *TSHR* 基因。序列分析可知，黄颡鱼 *TSHR* 基因 cDNA 序列全长 2 786 bp，其中开放阅读框 2 238 bp（239～2 476 bp），5’端非翻译区（UTR）为 238 bp（1～238 bp），3’端 UTR 为 310 bp（2 477～2 786 bp），共编码 745 个氨基酸，起始密码子为 ATG，终止密码子为 TAA（图 1），将该序列提交至 GenBank，获得登录号 KT722732。

```
1     ATGGGGCCTCTGGAAAGCAGATTTAGTTGAATAAGACTGCTGGAGCATTTGGGTGAGGCA
61    GACCCCTGGAGCTCTATCAGTCTTAACACATTTCTTCATTTATCACAGCAGTGCAGACTT
121   CTGCCTCTTGTGTTGTTCATGTAGACTCTAACACTTTTACTATCTGAGACAAACTGAGCA
181   CCGAAGATTAAATCTTGTGTTTTAACTTTAAGCTGCTTTTAAACGCCAATTATATAAAAT
                                                                M    1
241   GTGTCTATTAGCACTTGTGATTTTAACCTTCTGCTCCACTCGAACCTGCACCGGAGACAT
        C  L  L  A  L  V  I  L  T  F  C  S  T  R  T  C  T  G  D  I   21
301   TAATAAGTGTCCTCATGGGTGTGATTGCACAGACTGGAAAGGTTTTTATGTTTCGTGTAC
        N  K  C  P  H  G  C  D  C  T  D  W  K  G  F  Y  V  S  C  T   41
361   AGATATTTCTACCTTGCCGTTGTTTCCTGGAAACACTGAGACACTACGTCTCTATGAAAC
        D  I  S  T  L  P  L  F  P  G  N  T  E  T  L  R  L  Y  E  T   61
421   AAGACTGAGCTCTGTTCCTAAAGACGCATTTGCCAACATGGTGAACATCTCATTAATTTA
        R  L  S  S  V  P  K  D  A  F  A  N  M  V  N  I  S  L  I  Y   81
481   TCTCTCAGTTGATGTCACATTAAGAAGTTTAGAGAAGCATTCCCTTTTCAACCTGAAGAA
        L  S  V  D  V  T  L  R  S  L  E  K  H  S  L  F  N  L  K  K  101
541   GATTACACATATAGAAATAAGAAACACCAGAAGTCTGACGACTATCGATCCTGAAGCTTT
        I  T  H  I  E  I  R  N  T  R  S  L  T  T  I  D  P  E  A  F  121
601   CAAAGATTTACCAAAGTTAAAATATTTAGGTTTGTTCAATACTGGACTCACCATCTTTCC
        K  D  L  P  K  L  K  Y  L  G  L  F  N  T  G  L  T  I  F  P  141
661   TGCACTGACAAGGATCCGTTCTGATGAATCATCTTTCATGCTAGAAATTACTGATAATAT
        A  L  T  R  I  R  S  D  E  S  S  F  M  L  E  I  T  D  N  I  161
721   TTACATCACTGAAATTCCTGCAAATGCATTCCAAGGCATTACCAATGATGTGCTAACGGT
        Y  I  T  E  I  P  A  N  A  F  Q  G  I  T  N  D  V  L  T  V  181
781   GATGCTATACAGTAATGGCTTTACTAAAATCCAACACCATGCCTTCAATGGGACAAAACT
        M  L  Y  S  N  G  F  T  K  I  Q  H  H  A  F  N  G  T  K  L  201
841   AGATGCTATATATCTTCACCGAAACAAACAACTAACAGATCTGAGTGAAGACATGTTTGC
        D  A  I  Y  L  H  R  N  K  Q  L  T  D  L  S  E  D  M  F  A  221
901   AGAAACCTTTAGTGGTCCAGTGCTGCTTGATGTGTCTGACTCAGCCATTACCTCCCTTCC
        E  T  F  S  G  P  V  L  L  D  V  S  D  S  A  I  T  S  L  P  241
961   AGCAAGAGGACTAGAGTCACTCCGGGAACTCAGCGCTCGGAATGTTTGGGCCCTTAAAAA
        A  R  G  L  E  S  L  R  E  L  S  A  R  N  V  W  A  L  K  K  261
1021  ACTTCCACCTATCAAAACTTTCAGAAATCTGTTTGGTGCTGATATGACGTATCCTAGTCA
        L  P  P  I  K  T  F  R  N  L  F  G  A  D  M  T  Y  P  S  H  281
1081  TTGCTGTGCATTCAAGAACCTTAAGAAAAAGAAAGGGTACCTGGAACACATTCTTTGTAA
        C  C  A  F  K  N  L  K  K  K  K  G  Y  L  E  H  I  L  C  N  301
1141  CTTGACTGAAAAGCATGGTCAACATCACAAAAGATCAGTGGACACAGTTACAATCCCAGC
        L  T  E  K  H  G  Q  H  H  K  R  S  V  D  T  V  T  I  P  A  321
1201  TGTCATGGATGCTAAAGACTCAAAAGACATGAGTGACCTCCTACATAAGAACAACTATAA
        V  M  D  A  K  D  S  K  D  M  S  D  L  L  H  K  N  N  Y  N  341
1261  CCATTACGACTTTCTTAGTAGTCTACATTATCATGACTTTGTTGGTGGGCATGCTGACCA
        H  Y  D  F  L  S  S  L  H  Y  H  D  F  V  G  G  H  A  D  H  361
1321  TGATTTGGGCTTTGGGGACACACTGAAGAATCCTCAGGCAGCCACCAGTCAGGACTTTGA
        D  L  G  F  G  D  T  L  K  N  P  Q  A  A  T  S  Q  D  F  D  381
1381  TAGTCATTATGACTATGTTATATGTGAGGATGGAGAAGCTGTGACATGCTTCCCAGTCCC
        S  H  Y  D  Y  V  I  C  E  D  G  E  A  V  T  C  F  P  V  P  401
1441  TGATGACTTCAACCCCTGTGAGGACATCATGGGTTTCAGCTTCCTGAGAGTGTCTGTTTG
        D  D  F  N  P  C  E  D  I  M  G  F  S  F  L  R  V  S  V  W  421
1501  GTTTGTCAGTTTGCTGGCTGTACTTGGAAATTTGATGGTGCTCTTTGTGCTCCTCACCAG
        F  V  S  L  L  A  V  L  G  N  L  M  V  L  F  V  L  L  T  S  441
1561  TCATTACAAACTATCTGTCTCCCGGTTCCTTATGTGCCACCTGGCATTTGCTGACTTCTG
        H  Y  K  L  S  V  S  R  F  L  M  C  H  L  A  F  A  D  F  C  461
1621  CATGGGCCTCTATCTGCTTCTCATTGCCTCAGTGGACCTTTACACACAATCAGAATATTA
        M  G  L  Y  L  L  L  I  A  S  V  D  L  Y  T  Q  S  E  Y  Y  481
1681  CAATCATGCAATAGACTGGCAGACAGGACCATGGTGTACACTTGCTGGATTTATCTCCAT
        N  H  A  I  D  W  Q  T  G  P  W  C  T  L  A  G  F  I  S  I  501
1741  CTTTGCAAGCGAGTTGTCAGTTTACACCTTGACCACAATAACTCTGGAGCGCTGGCATGC
        F  A  S  E  L  S  V  Y  T  L  T  T  I  T  L  E  R  W  H  A  521
1801  AATCAACTTTGCAATTCATTTAGATCGTAAACTGCGTTTGTCACATGCCTCCGCTGTCAT
        I  N  F  A  I  H  L  D  R  K  L  R  L  S  H  A  S  A  V  M  541
1861  GCTTGGTGGATGGATCTTATGCTTCCTGCTGGCCCTTATGCCAGTGTTGGGGGTGAGCAG
        L  G  G  W  I  L  C  F  L  L  A  L  M  P  V  L  G  V  S  S  561
1921  TTACCAAAAGGTCAGCATATGCTTGCCCATGAGCACTCAGAACCTGTTGGACCAGGTCTA
        Y  Q  K  V  S  I  C  L  P  M  S  T  Q  N  L  L  D  Q  V  Y  581
1981  CATTTTATTTGTGTTAGTTCTTAACATTGTGGCCTTTGTGGTCATCTGTGCCTGCTACAT
        I  L  F  V  L  V  L  N  I  V  A  F  V  V  I  C  A  C  Y  I  601
2041  TAGGATCTACTGTGCAGTGCGCAACCCCACTTACACCTCAGCCAGCAAAGATAGCAGTAT
        R  I  Y  C  A  V  R  N  P  T  Y  T  S  A  S  K  D  S  S  I  621
2101  TGCTAAGCGCATGGCTGTGCTAATTTTCACTGACTTCCTCTGCATTGCACCAATCTCTTT
        A  K  R  M  A  V  L  I  F  T  D  F  L  C  I  A  P  I  S  F  641
2161  CTATGCCATATCGGCTGCACTGGATCATTCACTCATAACCATTTCAAATTCCAAGATCCT
        Y  A  I  S  A  A  L  D  H  S  L  I  T  I  S  N  S  K  I  L  661
2221  GCTTGTGCTCTTCTACCCTCTGAACTCCTGTGCTAATCCTTTTCTCTATGCCATATTTAC
        L  V  L  F  Y  P  L  N  S  C  A  N  P  F  L  Y  A  I  F  T  681
2281  CAAGGCCTTTCAGGGCGATGTATTTATCTTGCTCAGCAAGATTGGCCTGTGCGAGCAGCA
        K  A  F  Q  G  D  V  F  I  L  L  S  K  I  G  L  C  E  Q  Q  701
2341  GGCCCAAATGTTTCGAGGCCAAACTGTCTCCACAAAAGCAAGCAGCGGAGACACAAACAG
        A  Q  M  F  R  G  Q  T  V  S  T  K  A  S  S  G  D  T  N  R  721
2401  GCGTGGAATAAGAACAAAAATGCTAACCCGATGGAATGTTCTGACCACTGCTACCTGTCA
        R  G  I  R  T  K  M  L  T  R  W  N  V  L  T  T  A  T  C  H  741
2461  TCAACAAGGACACTAACACATCAGGAGGCAGGAAATGTAAATCTACTGGCAATCAATACA
        Q  Q  G  H  *                                               745
2521  AGCACATTCATGAGATAAACTCAAATGGTGTCTTTTTTAAACCTGCTGGTTACTTAAAGA
2581  GGGGATTTAAAAGTTGTTTTTACTTAGCTAAATGCATGCCACATACTTGTGTGATAACAT
2641  TTACAGCTCTATGTATTTAATCGAAGAGAGAGATAATTTTGTAATGCATTATCTCAGTGT
2701  GAAGGAAGGAATGAGATGAAGAAAGGGGAGGATGTTACACTGAATGCCCAGGGAAAAAAA
2761  AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
```

起始密码子和终止密码子用方框标示，信号肽序列（1～19 号氨基酸）用下划线标示，N-糖基化位点用青色阴影标示，跨膜螺旋结构域用蓝色阴影标示。

The start and stop codons are boxed, the putative signal peptide is underlined whereas N-linked glycosylation sites are marked in cyan with transmembrane helix domain boxed in blue.

图 1　黄颡鱼 *TSHR* 基因 cDNA 全长核苷酸序列及推导的氨基酸序列

Fig.1　cDNA full-long sequence and deduced amino acid sequence of *TSHR* gene in yellow catfish

DNAStar 软件 Editseq 程序预测分析说明：黄颡鱼 TSHR 蛋白质序列包括 63 个强碱性氨基酸（K、R），65 个强酸性氨基酸（D、E），293 个疏水氨基酸（A、I、L、F、W、V），221 个极性氨基酸（N、C、Q、S、T、Y），该蛋白质的分子质量约为 83.8 ku，理论的等电点（pI）为 7.163。经 SignalP 4.1 Server 在线软件预测分析该蛋白质序列的信号肽结构，发现 TSHR 蛋白质序列的 N 端信号肽为第 1～19 位的氨基酸（MCLLALVILTFCSTRTCTG），并且在第 19 和 20 位的氨基酸上可能存在裂解位点（图 1）。

TSHR 是贯穿脂双层的跨膜蛋白，黄颡鱼 TSHR 氨基酸序列包含长度为 264 个氨基酸的疏水性 7 次跨膜螺旋区，分别位于 421～443、450～472、487～509、540～562、582～604、625～647 和 662～684 氨基酸处和长度为 420 个氨基酸的胞外区（1～420 氨基酸处）：包含 N-末端的信号肽序列、长度为 61 个氨基酸的膜内域（685～745 氨基酸处），膜外区和膜内区均呈亲水性。跨膜螺旋区是由 3 个胞内环和 3 个胞外环连接起来，是典型的 G-蛋白偶联受体结构。糖基化位点预测：黄颡鱼 *TSHR* 基因序列中有 3 个潜在的 N-糖基化位点和 20 个保守的半胱氨酸，其中糖基化位点分别是 ^{76}NISL、^{197}NGTK、^{301}NLTE（图 1）；磷酸化位点预测：TSHR 有 38 个蛋白激酶磷酸化位点，包括 20 个丝氨酸位点、11 个苏氨酸位点、7 个酪氨酸位点，其中胞外区有 14 个丝氨酸位点（^{39}S、^{64}S、^{65}S、^{90}S、^{95}S、^{148}S、^{151}S、^{247}S、^{252}S、^{280}S、^{328}S、^{332}S、^{337}S、^{382}S）、8 个苏氨酸位点（^{55}T、^{87}T、^{110}T、^{115}T、^{138}T、^{238}T、^{267}T、^{368}T）和 4 个酪氨酸位点（^{37}Y、^{351}Y、^{384}Y、^{386}Y），第 2 个胞内环内有 1 个丝氨酸位点（^{535}S），第 2 胞外环有 2 个酪氨酸位点（^{475}Y、^{480}Y），第 3 个胞内环有 2 个丝氨酸位点（^{616}S、^{619}S）、1 个酪氨酸位点（^{612}Y），胞内区有 3 个丝氨酸位点（^{711}S、^{715}S、^{716}S）、3 个苏氨酸位点（^{709}T、^{719}T、^{726}T）。二级结构：预测 TSHR 包含 21 个 α 螺旋、15 个 β 折叠和 34 个无规则卷曲。

SMART 预测保守结构域发现，TSHR 存在 4 个保守结构域，包括 3 个富亮氨酸重复[LRRNT（56～77 氨基酸处）、LRR_8（78～137 氨基酸处）、LRR_5（149～226 氨基酸处）]结构域和 1 个跨膜螺旋结构域[7tm_1（430～677 氨基酸处）]（图 2）。

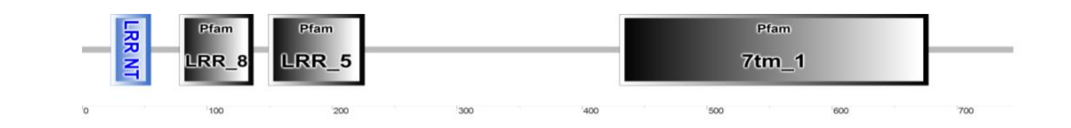


图 2　黄颡鱼 TSHR 序列保守的结构域

Fig.2　The conservative domain in TSHR sequence of yellow catfish

利用 Clustal X 进行序列比对，结果（图 3）显示，7 个跨膜螺旋区都处于保守性较高的区域。黄颡鱼 TSHR 氨基酸序列和其他鱼类已知的 TSHR 氨基酸序列有 57%～87%的相似度和 2.0%～11.5%的分歧度（表 3）。

表 3　不同物种 TSHR 氨基酸序列的相似度和分歧度　　%

Table 3　Percent identity and divergence of amino acid sequence among different species

		相似度 Percent identity					
	编号 No.	1	2	3	4	5	6
	1	-	87.0	57	69.1	68.6	83.6
	2	2.0	-	56.7	56.3	66．2	84.2
分歧度	3	10.2	8.5	-	58.4	58.5	52.2
Divergence	4	10.6	7.8	10.1	-	89	48
	5	11.5	10.6	5.8	2.6	-	47.1
	6	3.7	7.1	10.7	11.8	12.7	-

1：黄颡鱼 *Pelteobagrus fulvidraco*；2：斑点叉尾鮰 *Ictalurus punctatus*；3：斑马鱼 *Danio rerio*；4：大

口黑鲈 *Micropterus salmoides*；5：塞内加尔鳎 *Solea senegalensis*；6：非洲鲶 *Clarias gariepinus*。

```
Pelteobagrus fulvidraco   -------MCLLALVILTFCSTRTCTGDINKCPHGCDCTDWKGFYVSCTDISTLPLFPGNT 53
Clarias gariepinus        -------.R.F...LI.VF.HQ..SE.F.S..K...E..E...Y........G.M.R.... 53
Danio rerio               -------.MKTHVMLVLMLPLVSVI...WT.S.......E.SQ..ALV...M.VDSI.TL.ER. 52
Ictalurus punctatus       -------.R.F...LIF.F...........E.VKS..N...E.......Y........A...I..... 53
Micropterus salmoides     -----MQVIT-CALFTLVTLPISTVSEADS..AV.E.SE..SHTI..F..DI..R..AS. 54
Solea senegalensis        MLCRSVQVMTTCALFTLL.EPVLAVSEADS..AV.E.SE.QTHTI..F..DF..R..AS. 60

Pelteobagrus fulvidraco   ETLRLYETRLSSVPKDAFANMVNISLIYLSVDVTLRSLEKHSLFNLKKITHIEIRNTRSL 113
Clarias gariepinus        ...H..........Q...V.....................R.....FYA................ 113
Danio rerio               .V.S.H....TR................R......IF.SR..M..FHS.REL..........K. 112
Ictalurus punctatus       ..............Q...V..................................F.........V...... 113
Micropterus salmoides     ...W.F..........A...........R..I....M..QR.....FYS.R...........AK.. 114
Solea senegalensis        ...W.F..........A...........M..I.......QR..R..FYS.R.V.Q......AK.. 120

Pelteobagrus fulvidraco   TTIDPEAFKDLPKLKYLGLFNTGLTIFPALTRIRSDESSFMLEITDNIYITEIPANAFQG 173
Clarias gariepinus        ..........................................H.E.L..........S......... 173
Danio rerio               .F.H.....N..N.Q...................D..K.QAEN.Y.I...S..P..A........F. 172
Ictalurus punctatus       MS.........E............................H.H..N..........L........ 173
Micropterus salmoides     .Y.......N.TN......I.......Y..D.RN.H.NDMN.I...V.HPH........S.H. 174
Solea senegalensis        .YVN.....H.......P.I.......L..D.SN.H.RDMN.I...V.HP.M.......S.R. 180

Pelteobagrus fulvidraco   ITNDVLTVMLYSNGFTKIQHHAFNGTKLDAIYLHRNKQLTDLSEDMFAETFSGPVLLDVS 233
Clarias gariepinus        ..K.M..............A............S.....V......GR..Y.........T..I........L. 233
Danio rerio               ....L.SLR..........V.P...........SV.....RE..R.D.K....G.S....M..... 232
Ictalurus punctatus       ..K.A...................................E..E...............I........ 233
Micropterus salmoides     ..S.......G...RE...............QVD....RD..KMD.RA..G.I.....M..... 234
Solea senegalensis        ..S.....L...G...RE.H...........R..QVD....D..KMD.RA..G.I.....M..... 240

Pelteobagrus fulvidraco   DSAITSLPARGLESLRELSARNVWALKKLPPIKTFRNLFGADMTYPSHCCAFKNLKKKKG 293
Clarias gariepinus        ..RV.....S.....T...........S.......VE....H.IS...........................R 293
Danio rerio               E.GV.........D.......C......................H.VT....L.................R. 292
Ictalurus punctatus       ..GV......T......................SV.....H.I............................. 293
Micropterus salmoides     LTG.N....TT.MG......K...A.........A.....KH.TI..NL..........G.......R. 294
Solea senegalensis        LTG.R....TA.MD......K...T.S.............KH.SI..NL..........G.......R. 300

Pelteobagrus fulvidraco   YLEHILCNLTEKHGQHHKRSVDTVTIPAVMDA--------KDS-KDMSDLLHKNNYNHYD 344
Clarias gariepinus        ..DY.I.....A...RDI..-LA....V...L..G--------I.KGI...NS.LRKT.D.H. 344
Danio rerio               FI.E.I.....ARKN.VQ....RAF..HGLQG------S--MEPGI.L...N.FRDT.D.QE 344
Ictalurus punctatus       ..DY.I.....AMR...YE....GRI.V.......G--------T.KGI.I...P.LG.T.D.H. 345
Micropterus salmoides     F..Y.I.....AFYD.........GPLRM.SLQGESVAETIPDEEPNDGHRERESQQDWWRG. 354
Solea senegalensis        F..YLI.....ALQD.........GPL.RTSFQGDSMLETVSDLEPHDGGQIESQQQDWRRG. 360

Pelteobagrus fulvidraco   FLSSLHYHDFVGGHADHDLGFGDTLKNPQAATSQDFDSHYDYVICEDGEAVTCFPVPDDF 404
Clarias gariepinus        ...N...P.LLDE.SY..M....A.....VS....I...............T....T.A.... 404
Danio rerio               .FGNG..PTYFDR...ENM...E.........ED..RE...R....IV...K..E.A...A..E. 404
Ictalurus punctatus       ..R.......E.L.......Y.M...............I......................A..A.A.... 405
Micropterus salmoides     .HG.....AYF..QP.E.V...E.........ED.......R.......V...E..E.E.A......E. 414
Solea senegalensis        .HG.....AYF..QP.E.V...E.........ED.......R.......V...E..E.A.S......E. 420

Pelteobagrus fulvidraco   NPCEDIMGFSFLRVSVWFVSLLAVLGNLMVLFVLLTSHYKLSVSRFLMCHLAFADFCMGL 464
Clarias gariepinus        ..........................F..SV..................................L.L.I 464
Danio rerio               ..........................................L...L.........................V..L...I 464
Ictalurus punctatus       ..............................MV...............................I...L...I 465
Micropterus salmoides     ........G...................V...L.................................L...I 474
Solea senegalensis        ........G.......................I...VV...L..................................L...I 480

Pelteobagrus fulvidraco   YLLLIASVDLYTQSEYYNHAIDWQTGPWCTLAGFISIFASELSVYTLTTITLERWHAINF 524
Clarias gariepinus        ...F..........................................V...V............................ 524
Danio rerio               ..........H.............................G.S.....F.V.......................Y..TY 524
Ictalurus punctatus       ...........................................................T.......................... 525
Micropterus salmoides     ..........H..A...F.............G.G.......F.V..............V............Y..T. 534
Solea senegalensis        ..........H.RA...F.............G.G.......FTV..............V............Y..T. 540

Pelteobagrus fulvidraco   AIHLDRKLRLSHASAVMLGGWLCFLLALMPVLGVSSYQKVSICLPMSTQNLLDQVYILF 584
Clarias gariepinus        .MQ.......H...................V.....SL............................E........... 584
Danio rerio               .MR.................VI...I.....F.L...G.....LV..................D..T.V....I..IC 584
Ictalurus punctatus       .MQ.............................L...L........................................... 585
Micropterus salmoides     .MR......H.H...A.........VF.L.....L.LV...............D..STVA........S 594
Solea senegalensis        .MR.........H...A..........F.LV....L.LA...............D..STMA.....V.S 600

Pelteobagrus fulvidraco   VLVLNIVAFVVICACYIRIYCAVRNPTYTSASKDSSIAKRMAVLIFTDFLCIAPISFYAI 644
Clarias gariepinus        M..I.......................K...Y..H.............................................. 644
Danio rerio               ..........L..I......V......K......H...SHQ.SN..TN..................M.......L...M 644
Ictalurus punctatus       I..I..........A..............K......H..N....SR.................N...................... 645
Micropterus salmoides     ..........L..L...........FK......H..H.R.G....TN..................M..........M 654
Solea senegalensis        ..........L..L...........FK......H..H.R.G....TN..................M..........M 660

Pelteobagrus fulvidraco   SAALDHSLITISNSKILLVLFYPLNSCANPFLYAIFTKAFQGDVFILLSKIGLCEQQAQM 704
Clarias gariepinus        ........P...S...................................V...........................KK...L 704
Danio rerio               T.V......P......V...........................................V.....QR....L 704
Ictalurus punctatus       ........P......................................................................KL 705
Micropterus salmoides     ...V.NRP......V.....................................R...I..........V.....Q.R...L 714
Solea senegalensis        ...V...QP......V.....................................R...............V.....Q.....L 720

Pelteobagrus fulvidraco   FRGQTVSTKASSGDTNRRGIRTKMLTRWNVLTTATCHQQGH 745
Clarias gariepinus        Y....I.........R...SH..N.EI.K....QA....N.S.IKKDTNTSRGRKCKPTGHKF 764
Danio rerio               ........S.....R------TRHEREQ-------GAN-ETPISLLDFPG---KMAAAQQ 748
Ictalurus punctatus       .......I..R..................K..I.......QA.....SSVNKDNNTSRGRKCEPTANKS 765
Micropterus salmoides     ........S.G.-------TSQVRRDKDKFRKGGSGG.EEVPIHLKKCSGHTYHQAVCQQ 768
Solea senegalensis        ........S.G.-------TSQVRKDKCKIRKGGSGG.EELPIHLRKCSGYTCHQAVGQE 774

Pelteobagrus fulvidraco                                                         745
Clarias gariepinus        KQIKAMNSCGVFC                                         777
Danio rerio               QEDSDGQGA                                             757
Ictalurus punctatus       KHIQGMNSTMVFY                                         778
Micropterus salmoides     TSPEESQSPNT                                           779
Solea senegalensis        TVLKRARA                                              782
```

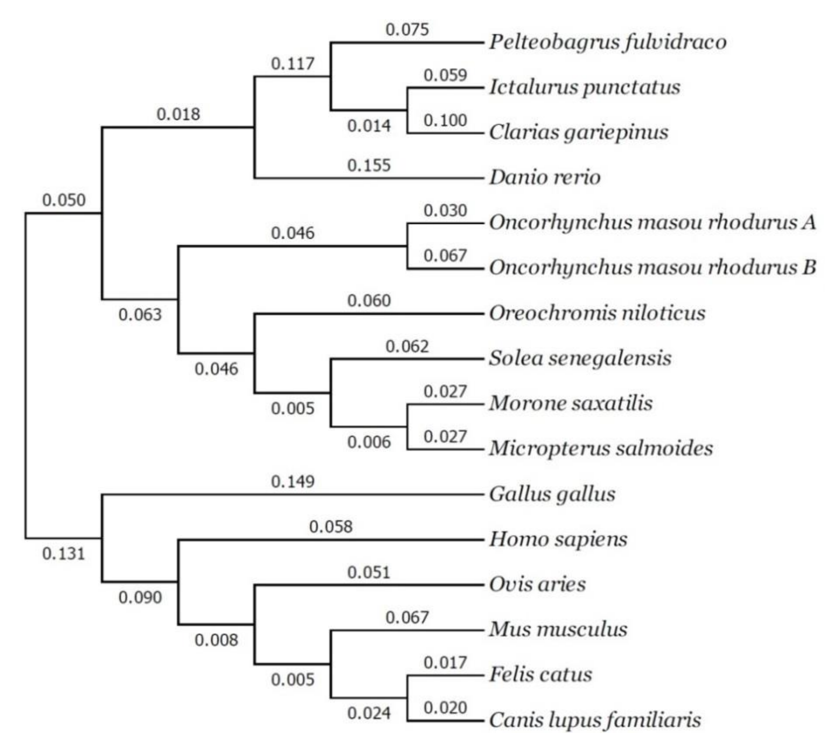
信号肽用下划线标示，跨膜域用蓝色阴影标示，保守的半胱氨酸用红色阴影标示。

The putative signal peptide is underlined whereas the predicted transmembrane domains are shaded in blue with conservative cysteine boxed in red.

图 3 不同物种间 TSHR 推导的氨基酸序列的比对

Fig.3 Comparison of the deduced amino acid sequences of TSHR among different fish species

黄颡鱼与条纹狼鲈、罗非鱼、塞内加尔鳎、大麻哈鱼 A 和大麻哈鱼 B、斑马鱼、非洲鲶、斑点叉尾鮰等 16 种物种的 TSHR 氨基酸序列的系统进化树列于图 4。从中可以看出整个进化树分为 2 个亚群，各种鱼类聚为 1 个亚群，哺乳类、两栖类、鸟类形成 1 个亚群。其中黄颡鱼 TSHR 处于鱼类这一分支，且与斑点叉尾鮰和非洲鲶亲缘关系最近，斑马鱼次之，与哺乳类的亲缘关系较远，分支和物种的进化关系一致，而且从进化树可以看出 TSHR 蛋白在漫长的进化过程中出现一定程度的分化。



分支上的数字代表遗传距离。

The number of branch is the genetic distance.

图 4 基于 TSHR 氨基酸序列采用 NJ 法构建的系统进化树

Fig.4　Phylogenetic tree based on TSHR amino acid sequences using NJ method

2.2　黄颡鱼*TSHR*基因的组织表达差异

黄颡鱼 *TSHR* 基因在不同组织中的表达情况列于图 5，结果显示，*TSHR* 基因在黄颡鱼各组织中均有表达且彼此之间存在差异，在甲状腺中的相对表达量较高，其次是肝脏、肌肉和肠道，在其他组织中的相对表达量较少。

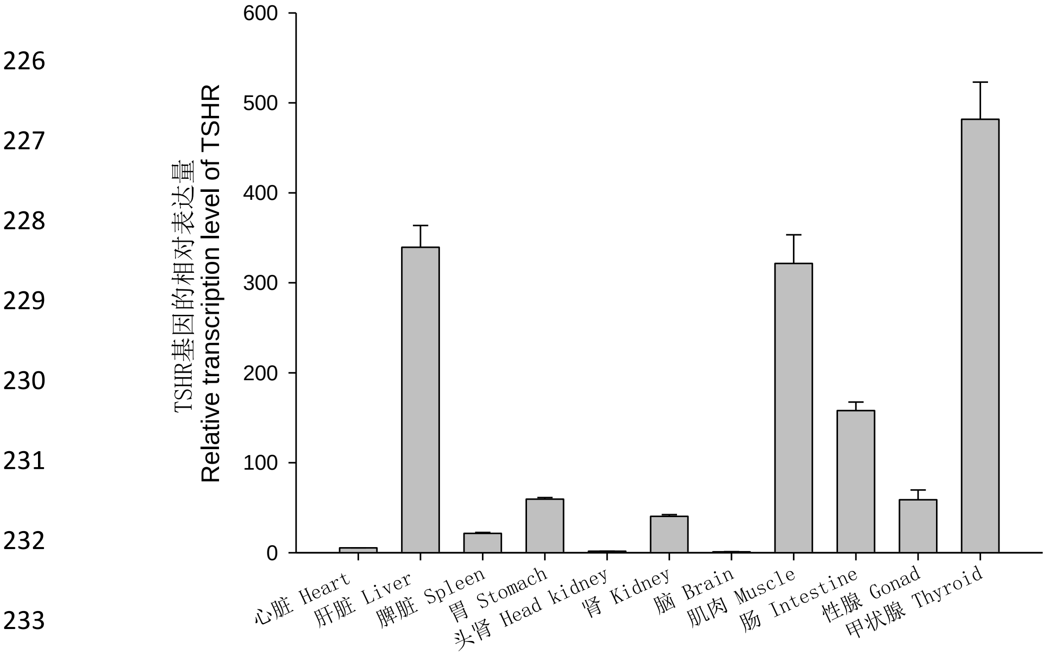


图 5　不同组织中 *TSHR* 基因的相对表达量

Fig.5　Relative expression level of *TSHR* in different tissues

2.3　饲料中添加碘化钾对黄颡鱼生长性能的影响

由表 4 可知，随饲料中碘化钾的添加量的升高增重和特定生长率呈现先升高后下降的趋势，饲料中碘化钾添加量为 50 和 100 mg/kg 时显著高于对照组（$P<0.05$）。各组之间摄食量差异不显著（$P>0.05$）。随饲料中碘化钾的添加量的升高，饲料系数呈现先降低后升高的趋势，与对照组相比，饲料中碘化钾添加量为 50 和 100 mg/kg 时，FCR 显著降低（$P<0.05$）。肥满度、肝胰脂数和肠指数各组之间均差异不显著（$P>0.05$）。

表 4　饲料中添加碘化钾对黄颡鱼生长性能的影响

Table 4　Effects of dietary potassium iodide addition on growth performance of *Pelteobagrus fulvidraco*

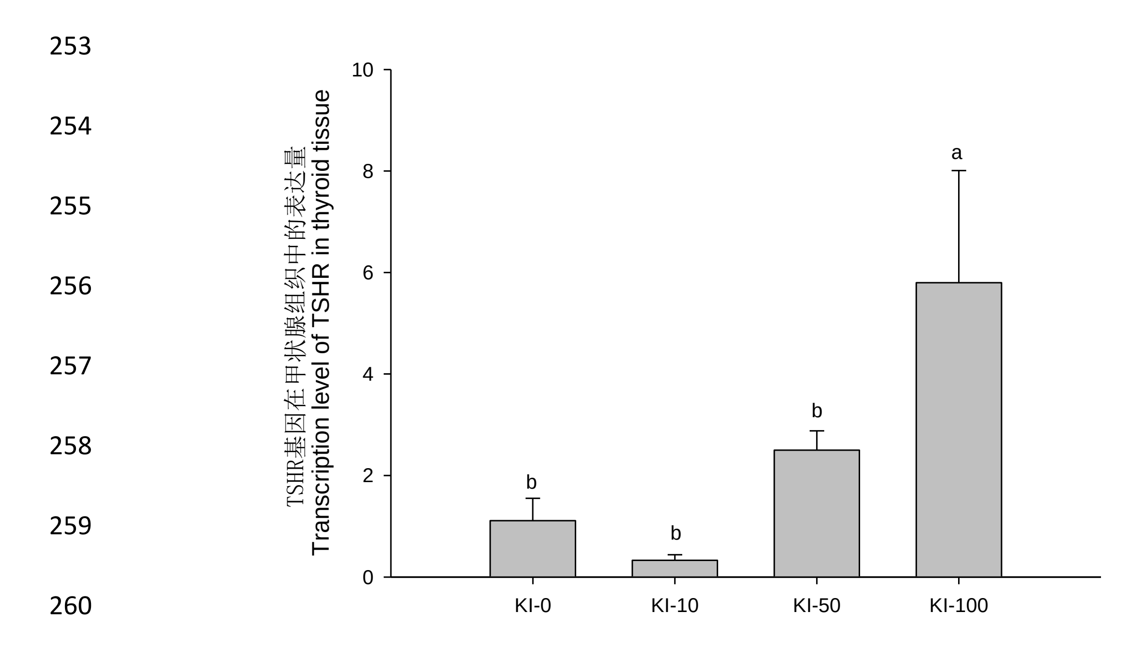
项目 Items	0	10	50	100
初重 Initial weight/(g/尾)	32.05±0.5	29.15±2.33	27.85±5.87	32.05±3.61
末重 Final weight/(g/尾)	38.10±2.69	36.55±2.48	38.65±7.14	42.45±2.90
增重 WG/g	6.05±2.19^{b}	7.45±0.21^{ab}	10.80±1.27^{a}	10.45±0.64^{a}
特定生长率 SGR/(g/d)	0.63±0.21^{b}	0.84±0.04^{ab}	1.22±0.09^{a}	1.05±0.16^{a}
摄食量 FI/(g/尾)	9.56±2.50	10.32±1.36	11.49±1.28	11.28±0.07
饲料系数 FCR	1.61±0.18^{a}	1.38±0.15^{ab}	1.07±0.01^{b}	1.08±0.06^{b}
肥满度 CF	1.34±0.31	1.24±0.17	1.29±0.26	1.31±0.25
肝胰指数 HSI/%	1.97±0.46	1.91±0.26	2.10±0.43	2.36±0.35
肠指数 Intestine index/%	1.03±0.27	0.88±0.35	1.05±0.46	1.24±0.19

同行数据肩标不同小写字母表示差异显著（P<0.05）。

Values in the same row with different small letter superscripts mean significant difference (P<0.05).

2.4　饲料中添加碘化钾对黄颡鱼甲状腺*TSHR*基因表达的影响

荧光定量 PCR 分析结果（图 6）显示，饲料中碘化钾添加量为 100 mg/kg 时黄颡鱼甲状腺 *TSHR* 基因的相对表达量显著高于其他组(P<0.05)，是其他组的 2.3~17.5 倍，其余各组之间差异不显著(P>0.05)。随着饲料中碘化钾添加量的增加，颡鱼甲状腺 *TSHR* 基因的表达量呈现先降低后升高趋势。



数据柱形标注不同小写字母表示差异显著（*P*<0.05）。

Value columns with different smallt letters mean significant difference (*P*<0.05).

图 6　饲料中添加碘化钾对黄颡鱼甲状腺 *TSHR* 基因表达的影响

Fig.6　Effects of dietary potassium iodide addition on expression of *TSHR* of *Pelteobagrus fulvidraco*

3　讨　论

3.1　黄颡鱼*TSHR*基因生物信息学分析

本研究成功获得黄颡鱼 *TSHR* 基因的 cDNA 全长为 2 786 bp，推导出黄颡鱼的 TSHR 蛋白由 745 个氨基酸组成，其氨基酸序列与鲶形目斑点叉尾鮰 TSHR 氨基酸序列的相似性最高（87%），且与其他鱼类的 TSHR 氨基酸序列的相似性也较高，并且该氨基酸序列具有糖蛋白受体家族的典型特征，Segaloff 等[23]认为 TSHR 属于 G-蛋白偶联受体家族中的 A 组，具有一个比较独特的大的胞外域，调节与促甲状腺激素的结合，胞外域中具有丰富的亮氨酸重复序列，胞外域约占总序列长度的 1/2，有 7tm_1 结构域，并且该结构域由 3 个胞外环和 3 个胞内环构成，这些都与本研究获得的 cDNA 序列相符合。Rocha 等[16]从性腺中克隆出来的

TSHR cDNA 基因序列也具有类似的典型糖蛋白家族特征。进化树分析表明鱼类、鸟类和哺乳类动物的 TSHR 最后聚为一支，预示着 TSHR 蛋白有着共同的祖先，只是随着时间推移，动物进化分化出了不同类型的受体蛋白。

比对黄颡鱼与其它相关物种的 TSHR 基因，发现黄颡鱼与斑点叉尾鮰和非洲鲶的相似性较高，其次是斑马鱼、大西洋鲑鱼等鱼类，动物分类与基因进化的关系相一致，表明 TSHR 基因在物种进化中具有保守性及其对生理功能发挥的重要性。

3.2　黄颡鱼 *TSHR* 基因组织表达特异性分析

本研究发现甲状腺和非甲状腺组织中均能检测到 *TSHR* 基因的表达，这一结果和 Vischer 等[14]、Goto-Kazeto 等[15]、Ponce 等[9]、Sampath-Kumar 等[8]、Rocha 等[16]分别对非洲鲶、斑点叉尾鮰、塞内加尔鳎、条纹狼鲈、欧洲鲈的研究结果一致，*TSHR* 基因除了在硬骨鱼的甲状腺中表达外，在心脏、肌肉、垂体、肠道、胃、肾、肝脏、脾脏、头肾、脑、性腺等组织中也有表达，只是各组织中 *TSHR* 基因表达丰度呈现出多样性。本研究结果显示 *TSHR* 基因在黄颡鱼的心脏、肝脏、脾脏、胃、肾脏、头肾、脑、肌肉、肠、性腺、甲状腺组织中均有表达，说明 TSHR 具有广泛的调节机体正常生理代谢的作用，其中脾脏是免疫器官，因此 *TSHR* 基因或许与免疫功能相关。已有研究证实哺乳动物的甲状腺内稳态的紊乱会导致其免疫细胞比例的变化[24]，在虹鳟的试验中，人为的改变甲状腺激素的状态会引起免疫系统中白细胞的组成发生变化[25]；Wang 等[26]也已经证明在早期的抗原免疫反应中，单核细胞、淋巴细胞、巨噬细胞、外周 T 细胞通过促甲状腺激素进行相互联系，而且促甲状腺激素具有免疫细胞调节因子的作用[27]，由此推测 TSHR 在脾脏中与促甲状腺激素结合起免疫调节作用，但 TSHR 具体免疫作用机理目前仍然不清楚。

3.3　饲料中添加碘化钾对黄颡鱼生长性能和 *TSHR* 基因表达的影响

本试验结果表明，饲料中添加碘化钾对黄颡鱼增重、特定生长率、饲料系数有显著影响，饲料中碘化钾添加量在 50 和 100 mg/kg 时可促进黄颡鱼的生长，提高饲料利用效率。这一

结果与之前的一些研究结果相符合，如 Witt 等[28]研究发现环境中的碘的含量与太平洋马鲅幼鱼的生长、成活率、变态发育以及鱼体内甲状腺激素的含量相关，适量的碘能促进其更快发育、更快生长并且提高成活率；Gensic 等[29]在虹鳟的饲料中添加碘后发现补充碘的虹鳟生长较好并且甲状腺激素的含量高，其成活率和疾病防御能力也相应提高。此外，Penglase 等[30]研究发现大西洋鳕鱼（*Gadus morhua*）幼虫摄食的碘含量为 129 mg/kg 时，碘对甲状腺产生毒性，这一含量超过了本试验所得到的碘化钾添加量的最大值，过量碘引起甲状腺活性降低，进而导致生长性能降低。也有一些研究结果与本研究结果不相符合，如 Ribeiro 等[31]研究表明海鲤饲料中不同水平或不同化学组成的碘（最大的含量为 26 mg/kg，相当于碘化钾 34.4 mg/kg）对海鲤的摄食量、生长率、饲料系数均没有显著影响；Bowzer 等[32]将大眼梭鲈的胚胎暴露于 100 mg/L 的碘溶液中 30 min 中，发现碘会降低胚胎的成活率，但并不影响其生长，原因可能是碘的添加量、碘化物的种类和鱼体发育的阶段性等因素的不同引起的。

促甲状腺激素能与甲状腺滤泡细胞表面的 TSHR 结合，调节钠碘转运蛋白的表达[33]，随后钠碘转运蛋白以主动运输的形式将碘转入甲状腺滤泡组织中的[34-35]，最终促进甲状腺合成并分泌甲状腺激素，使甲状腺维持正常的活性状态，在此过程中，*TSHR* 基因起着关键的作用，若碘的供应量不足，或引起钠碘转运蛋白过剩，进而抑制 *TSHR* 基因的表达，因此在一定范围内，随着碘含量的升高，*TSHR* 基因的表达量也会相应提高。本研究中 *TSHR* 的相对表达量随着 KI 添加量的增加，呈现上升的趋势，符合理论预期。碘对 *TSHR* 基因的影响最终会转化成对甲状腺激素和甲状腺功能的影响，如 Burel 等[36]和 Mustafa 等[37]均发现饲料中足够的碘能够提高机体甲状腺激素的含量，并且能提高其抗病能力，减少有害物质对生长的影响。Ribeiro 等[6]通过循环系统饲养塞内加尔鳎研究碘和硒对其甲状腺结构的影响，发现饲料中添加碘能提高塞内加尔鳎幼鱼的成活率以及相应的减少甲状腺畸形（甲状腺肿）的发生率，从而提高鱼体的生长速率。反之，碘缺乏对鱼体引起的负作用也得到证实，如缺乏碘在鱼幼虫变形初期会引起甲状腺活性降低，这已在大西洋比目鱼中得到确认[38]。本研究结

果与上述研究结果相一致，由此可初步推断饲料中的碘能够通过甲状腺轴这一内分泌途径调节黄颡鱼的生长性能，这也为提高黄颡鱼养殖的经济效益提供了一个可行的途径。

4 结 论

① 本研究从黄颡鱼组织中成功克隆了 *TSHR* 基因的 cDNA 全长序列，GenBank 登录号为 KT722732。

② *TSHR* 基因在甲状腺组织中的相对表达量较高，其次是肝脏、肌肉和肠道，其他组织中相对较少。

③ 饲料中添加碘化钾显著影响黄颡鱼的增重、特定生长率和饲料系数以及甲状腺 *TSHR* 基因的表达。

参考文献：

[1] 华雪铭,闫大伟,周洪琪.壳聚糖通过甲状腺激素对草鱼免疫功能的调节[J].中国水产科学,2008,15(4):630–636.

[2] 瞿璟琰,施华宏,刘青坡,等.污染物对鱼类的甲状腺激素干扰效应及其作用机制[J].生态毒理学报,2007,2(4):375–380.

[3] 张颖,姚旋,宋宜云,等.甲状腺激素与代谢调控[J].生命科学,2013,25(2):176–183.

[4] LAM S H,SIN Y M,GONG Z,et al.Effects of thyroid hormone on the development of immune system in zebrafish[J].General and Comparative Endocrinology,2005,142(3):325–335.

[5] 张晓娜,田华,汝少国.鱼类甲状腺轴对胚胎发育、仔鱼变态及性别分化的调控作用研究进展[J].中国海洋大学学报,2012,42(Suppl):94–101.

[6] RIBEIRO A R A,RIBEIRO L,SÆLE Ø,et al.Iodine and selenium supplementation increased survival and changed thyroid hormone status in Senegalese sole (*Solea senegalensis*) larvae reared in a recirculation system[J].Fish Physiologyand Biochemistry,2012,38(3):725–734.

[7] SARGENT J R,TOCHER D R,BELL J B.The lipids[M].3rd ed.//HALVER J E,HARDY R W.Fish Nutrition.San Diego:Academic Press,2002:259.

[8] SAMPATH-KUMAR R,IJIRI S,KIGHT K,et al.Cloning and functional expression of a thyrotropin receptor from the gonads of a vertebrate (bony fish):potential thyroid-independent role for thyrotropin in reproduction[J].Molecular and Cellular Endocrinology,2000,167(1/2):1–9.

[9] PONCE M,INFANTE C,MANCHADO M.Molecular characterization and gene expression of thyrotropin receptor (TSHR) and a truncated TSHR-like in *Senegalese sole*[J].General and Comparative Endocrinology,2010,168(3):431–439.

[10] GROMMEN S V H,TANIUCHI S,DARRAS V M,et al.Identification of unique thyrotropin receptor (TSHR) splice variants in the chicken:the chicken *TSHR* gene revisited[J].General and Comparative Endocrinology,2008,156(3):460–463.

[11] JACOBS C,PIRSON I.Pitfalls in the use of transfected overexpression systems to study membrane proteins function:the case of TSH receptor and PRA1[J].Molecular and Cellular Endocrinology,2003,209(1/2):71–75.

[12] KURSAWE R,PASCHKE R.Modulation of TSHR signaling by posttranslational modifications[J].Trends in Endocrinology & Metabolism,2007,18(5):199–207.

[13] OBA Y,HIRAI T,YOSHIURA Y,et al.Cloning,functional characterization,and expression of thyrotropin receptors in the thyroid of amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*)[J].Biochemical and Biophysical Research Communications,2000,276(1):258–263.

[14] VISCHER H F,BOGERD J.Cloning and functional characterization of a testicular TSH receptor cDNA from the African catfish (*Clarias gariepinus*) [J].Journal of Molecular

Endocrinology,2003,30(2):227–238.

[15] GOTO-KAZETO R,KAZETO Y,TRANT J M.Cloning and seasonal changes in ovarian expression of a TSH receptor in the channel catfish,*Ictalurus punctatus*[J].Fish Physiology and Biochemistry,2003,28(1/2/3/4):339–340.

[16] ROCHA A,GÓMEZ A,GALAY-BURGOS M,et al.Molecular characterization and seasonal changes in gonadal expression of a thyrotropin receptor in the European sea bass[J].General and Comparative Endocrinology,2007,152(1):89–101.

[17] 中华人民共和国卫生部.GB/T 5009.5–2010 食品安全国家标准 食品中蛋白质的测定[S].北京:中国标准出版社,2010.

[18] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局,中国国家标准化管理委员会.GB/T 6433–2006 饲料中粗脂肪的测定[S].北京:中国标准出版社,2006.

[19] 中华人民共和国卫生部.GB/T 5009.4–2010 食品安全国家标准 食品中灰分的测定[S].北京:中国标准出版社,2010.

[20] 中华人民共和国卫生部.GB/T 5009.3–2010 食品安全国家标准 食品中水分的测定[S].北京:中国标准出版社,2010.

[21] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局,中国国家标准化管理委员会.GB/T 13882–2010 饲料中碘的测定 硫氰酸铁-亚硝酸催化动力学法[S].北京:中国标准出版社,2011.

[22] STEPHENSON F H.Calculations for molecular biology and biotechnology:a guide to mathematics in the laboratory[M].2nd ed.New York:Academic Press,2010.

[23] SEGALOFF D L,ASCOLI M.Thyroid-stimulating hormone/luteinizing hormone/follicle-stimulating hormone receptors[M].2nd ed.//Encyclopedia of Biological Chemistry.Waltham:Academic Press,2013:387–391.

[24] HODKINSON C F,SIMPSON E E A,BEATTIE J H,et al.Preliminary evidence of immune function modulation by thyroid hormones in healthy men and women aged 55-70 years[J].The Journal of Endocrinology,2009,202(1):55–63.

[25] QUESADA-GARCÍA A,VALDEHITA A,KROPF C,et al.Thyroid signaling in immune organs and cells of the teleost fish rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)[J].Fish & Shellfish Immunology,2014,38(1):166–174.

[26] WANG H C,KLEIN J R.Immune function of thyroid stimulating hormone and receptor[J].Critical Reviews in Immunity,2001,21(4):323–337.

[27] KLEIN J R.Physiological relevance of thyroid stimulating hormone and thyroid stimulating hormone receptor in tissues other than the thyroid[J].Autoimmunity,2003,36(6/7):417–421.

[28] WITT E M,LAIDLEY C W,LIU K K M,et al.Correlation between environmental iodide concentrations and larval growth,survival,and whole body concentrations of thyroid hormones and cortisol in Pacific threadfin (*Polydactylus sexfilis*)[J].Aquaculture,2009,289(3/4):357–364.

[29] GENSIC M,WISSING P J,KEEFE T R,et al.Effects of iodized feed on stress modulation in steelhead trout,*Oncorhynchus mykiss* (Walbaum)[J].Aquaculture Research,2004,35(12):1117–1121.

[30] PENGLASE S,HARBOE T,SÆLE Ø,et al.Iodine nutrition and toxicity in Atlantic cod (*Gadus morhua*) larvae[J].PeerJ,2013,1:e20.

[31] RIBEIRO A R,GONCALVES A,COLEN R,et al.Dietary macroalgae is a natural and effective tool to fortify gilthead seabream fillets with iodine:effects on growth,sensory quality and nutritional value[J].Aquaculture,2015,437:51–59.

[32] BOWZER J,DABROWSKI K,JAROSZEWSKA M,et al.Evaluation of the viability and

growth of walleye embryos and larvae after antiviral iodine treatment[J].North American Journal of Aquaculture,2011,73(4):383–392.

[33] RIEDEL C,LEVY O,CARRASCO N.Post-transcriptional regulation of the sodium/iodide symporter by thyrotropin[J].Journal of Biological Chemistry,2001,276(24):21458–21463.

[34] VAYRE L,SABOURIN J C,CAILLOU B,et al.Immunohistochemical analysis of Na^+/I^- symporter distribution in human extra-thyroidal tissues[J].European Journal of Endocrinology,1999,141(4):382–386.

[35] DE LA VIEJA A,DOHAN O,LEVY O,et al.Molecular analysis of the sodium/iodide symporter:impact on thyroid and extrathyroid pathophysiology[J].Physiological Reviews,2000,80(3):1083–1105.

[36] BUREL C,BOUJARD T,KAUSHIK S J,et al.Effects of rapeseed meal-glucosinolates on thyroid metabolism and feed utilization in rainbow trout[J].General and Comparative Endocrinology,2001,124(3):343–358.

[37] MUSTAFA A,MACKINNON B M.Atlantic salmon,*Salmo salar* L.,and Arctic char,*Salvelinus alpinus* (L.):comparative correlation between iodine-iodide supplementation,thyroid hormone levels,plasma cortisol levels,and infection intensity with the sea louse *Caligus elongatus*[J].Canadian Journal of Zoology,1999,77(7):1092–1101.

[38] SOLBAKKEN J S,BERNTESSEN M H G,NORBERG B,et al.Different iodine and thyroid hormone levels between Atlantic halibut larvae fed wild zooplankton or *Artemia* from first exogenous feeding until post metamorphosis[J].Journal of Fish Biology,2002,61(6):1345–1362.

Thyrotropin Receptor Gene Cloning and Expression Response to Dietary Potassium Iodide Addition of Yellow Catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*)

WANG Chunling[1,2] ZHANG Hongta[1] GAO Youling[1*] QIAN Guoying[1*]

(1. *College of Biological and Environmental Sciences*, *Zhejiang Wanli University*, *Ningbo* 315100, *China*; 2.*College of Fisheries and Life Sciences*, *Shanghai Ocean University*, *Shanghai* 201306, *China*）

Abstract: The aim of the present study was to characterize the cDNA full-long sequence of thyrotropin receptor (TSHR) gene of yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*), and to determine the differential expression of *TSHR* gene in different tissues. In addition, the effects of dietary potassium iodide (KI) addition on *TSHR* gene expression and growth performance of yellow catfish were revealed. The rapid amplification of cDNA ends （RACE） technique was used to clone the cDNA full-long sequence of *TSHR* gene. Moreover, RT-qPCR technique was used to determine the relative expression level of *TSHR* gene. The KI adding levels were set to be 0 （control）, 10, 50 and 100 mg/kg in four experimental diets, which were fed to yellow catfish for 27 days. The results showed as follows: The cDNA full-length sequence of *TSHR* gene was obtained, and it was 2 786 bp, including a complete open reading frame of 2 238 bp encoded a 745 amino acid residues. Blast online analysis indicated that the amino acid sequence of yellow catfish displayed 60% to 87% identity as compared with other known fish species. The analysis results of tissue differential expression of *TSHR* gene indicated that the highest relative expression level was in thyroid, followed by liver, muscle and intestine. The results of feeding trial were showed that

*Corresponding authors: GAO Youling, associate professor, E-mail: gaoyl@zwu.edu.cn; QIAN Guoying, professor, E-mail: qiangy@zwu.edu.cn （责任编辑 菅景颖）

the relative expression level of *TSHR* gene in thyroid in 100 mg/kg group was significantly higher than that in other groups (*P*<0.05), and the weight gain, specific growth rate and feed conversion ratio in 50 and 100 mg/kg groups were significantly higher than those in control group (*P*<0.05). The results in this study imply that the dietary KI in the appropriate amount not only affects the expression of *TSHR* gene, but also promote the growth of yellow catfish effectively.

Key words: yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*); potasium iodide; thyrotropin receptor; gene clone; gene expression